Lehrstuhl für Experimentelle Zahnheilkunde
(Vostand: Prof. Dr. G. Siebert)
an der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. dent. R. Naujoks

Vergleichende Untersuchungen über die Hydrolyse wasserunlöslicher extrazellulärer Polysaccaride oraler Streptokokken durch Dextranasen in vitro.

Inaugural - Dissertation
verfaßt auf der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilian-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Ruth Kallert
aus Ochsenfurt

Würzburg, den 11. April 1980

Lehrstuhl für Experimentelle Zahnheilkunde
(Vostand: Prof. Dr. G. Siebert)
an der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. dent. R. Naujoks

Vergleichende Untersuchungen über die Hydrolyse wasserunlöslicher extrazellulärer Polysaccaride oraler Streptokokken durch Dextranasen in vitro.

Inaugural - Dissertation
verfaßt auf der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilian-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Ruth Kallert
aus Ochsenfurt

Würzburg, den 11. April 1980

Referent:	Professor Dr. F. Gehring
Korreferent:	Professor Dr. R. Naujoks
Dekan:	Professor Dr. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 10.7.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

Inhaltsverzeichnis Seite

1. Einleitung 1

2. Material und Methoden 5
2.1. Material 5
2.2. Methoden 6

3. Ergebnisse 9
3.1. Enzymatische Hydrolyse von Dextran T 2000 9
3.2. Enzymatische Hydrolyse extrazellulärer Polysaccharide von Streptococcus mutans 14
3.3. Enzymatische Hydrolyse extrazellulärer Polysaccharide von Streptococcus sanguis 17
3.4. Enzymatische Hydrolyse extrazellulärer Polysaccharide von Streptococcus salivarius 20

4. Diskussion 24
4.1. Enzymatische Hydrolyse von Dextran T 2000 24
4.2. Enzymatische Hydrolyse extrazellulärer Polysaccharide von Streptococcus mutans 26
4.3. Enzymatische Hydrolyse extrazellulärer Polysaccharide von Streptococcus sanguis 30
4.4. Enzymatische Hydrolyse extrazellulärer Polysaccharide von Streptococcus salivarius 31
4.5. Schlußfolgerungen für eine mögliche Verwendung von polysaccharidspaltenden Enzymen in der Kariesprophylaxe 33

5. Zusammenfassung 39

6. Literaturverzeichnis 41

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543521_0023

1. Einleitung

In der Ätiologie der Zahnkaries spielen die in der Mundhöhle vorkommenden Mikroorganismen eine wesentliche Rolle. Sie bauen die mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate unter anaeroben Bedingungen in den Zahnbelägen zu organischen Säuren ab, die eine Demineralisierung der Zahnhartsubstanz bewirken (24).

Auffallend häufig können Streptokokken, besonders S. mutans und S. sanguis, aus den Plaques über Initialläsionen isoliert werden (13, 18). Diese Streptokokkenarten besitzen - wie auch S. salivarius - die Fähigkeit, aus Saccharose extrazelluläre Polysaccharide (EPS) zu synthetisieren, die als Bestandteil der Plaques ein wesentlicher Faktor für die Entstehung der Karies sind (5, 19, 24, 27). Die wasserlöslichen EPS vom Glucantyp (Glukosepolymere) sowie Fructane (Fruktosepolymere, Lävane)(11) können als Reservekohlenhydrate dienen und in Zeiten der Nahrungskarenz den Bakterienstoffwechsel und damit die Entstehung demineralisierender Säuren aufrechterhalten (24). Von größerer Wichtigkeit aber sind die wasserunlöslichen Glucane als Bestandteil der Plaquematrix, die wegen ihres z.T. klebrigen Charakters die Anheftung der Mikroorganismen an der Zahnoberfläche und den Zusammenhalt untereinander mitermöglicht und somit die Voraussetzungen für die Entstehung einer gut haftenden Plaqueschicht schaffen (5, 17, 24). Diese unlöslichen EPS können eventuell auch als Diffusionsbarriere wirken und das Abwandern der H^+-Ionen aus den zahnnahen Bereichen verzögern (10).

Aus diesen Erkenntnissen wurde der Schluß gezogen, daß die Verhinderung der Synthese von EPS wie auch der Abbau bereits entstandener EPS in vivo eine Maßnahme der Kariesprophylaxe darstellen müßte. Es liegen auch bereits eine Anzahl tierexperimenteller und klinischer Untersuchungen vor, in denen durch den Einsatz Polysaccharid-spaltender Enzyme dieses Ziel zu erreichen versucht wurde. KÖNIG und GUGGENHEIM (32) konnten bei Ratten in relativer Gnotobiose, denen verschiedene S. mutans-Stämme inokuliert worden waren, durch Zugabe von Dextranase zum Futter die Plaquebildung und Kariesentwicklung reduzieren. Beimischung des Enzyms zum Trinkwasser allein genügte jedoch nicht. Bei späteren Versuchen mit Ratten, deren Mundflora unbeeinflußt war, erreichten diese Autoren dagegen keinen Erfolg mit Dextranase (21), wohl aber mit Mutanase (α-1,3-Glucanhydrolase) bzw. einer Kombination beider Enzyme (23). FITZGERALD et al. (15) testeten die Wirkung von Dextranase bei Hamstern und erzielten durch Zusatz des Enzyms zum Trinkwasser und Futter der Tiere einen deutlich geringeren Kariesbefall im Vergleich mit Kontrolltieren. BLOCK et al. (1) fanden positive Ergebnisse bereits bei Anwendung dieses Enzyms im Trinkwasser allein. Langzeitversuche mit Affen weisen ebenfalls auf eine kariesreduzierende Wirkung von Dextranasen hin (4).

Auch eine Reihe klinischer Versuche, durch Mundspülungen mit Enzymlösungen die Plaqueentwicklung zu beeinflussen, wurden durchgeführt. In einer Studie an Kindern und Jugendlichen konnten CALDWELL et al. (7) weder einen Plaqueabbau noch eine Hemmung der Plaquebildung erzielen. Auch NYMAN et al. (39) fanden keine Beeinflussung des Plaque- und Gingivaindex durch Dextranase bakteriellen Ursprungs. Demgegenüber beobachtete LOBENE (35) bei ent-

sprechenden Untersuchungen an Studenten zwar keine Veränderung in der Plaqueausdehnung, aber eine deutliche Verringerung des Plaquegewichtes. KEYES et al. (31) waren bei ihren Versuchen noch erfolgreicher. Sie fanden sowohl eine Verzögerung der Plaqueentwicklung als auch eine zwar geringe, aber doch deutliche Reduktion bereits gebildeter Plaques durch Spülungen mit Dextranaselösungen.

Die einander widersprechenden Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen dürften weitgehend dadurch bedingt sein, daß die Kenntnisse über die chemische Natur der EPS seinerzeit noch zu gering waren. So wurde ursprünglich vermutet, die EPS seien Dextrane, bei denen die Glukosemoleküle überwiegend durch α -1,6-Bindungen miteinander verknüpft sind (20). Dieser Bindungstyp wird durch Dextranase hydrolysiert. Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, daß vor allem die unlöslichen EPS einen hohen Anteil an α -1,3-Bindungen besitzen (8), die durch Dextranase nicht gespalten werden können. Deshalb wurden auch Glucan-1,3-hydrolasen in die Tierexperimente einbezogen (23). Für den häufig negativen Ausgang der klinischen Studien dürfte außer den erwähnten Gründen noch die Applikationsform und -dauer mitverantwortlich sein. Bei einer Mundspülung von nur wenigen Minuten Dauer wird nur ein Teil der in den Plaques enthaltenen EPS mit dem Enzym Kontakt bekommen und die Reaktionszeit ist insgesamt sehr kurz im Vergleich zu den Tierexperimenten.

In in-vitro Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, daß einzelne Dextranasepräparate wasserunlösliche EPS oraler Streptokokken in zum Teil beträchtlichem Ausmaß zu wasserlöslichen Produkten hydrolysieren können und daß auch bei einer Einwirkungszeit von nur drei Minuten manche EPS

stark abgebaut wurden (40). Es schien deshalb angebracht, weitere Enzympräparate unter vergleichbaren Bedingungen zu prüfen. Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, im Handel erhältliche Dextranasen unter Laborbedingungen auf ihre Wirksamkeit gegenüber EPS verschiedener Stämme von S. mutans, S. sanguis und S. salivarius zu testen. Nur Enzympräparate, die sich unter optimalen Bedingungen in vitro bewähren, haben eine Chance, auch unter den ungleich ungünstigeren Bedingungen in vivo im Rahmen eines Tierversuchs oder klinischer Studien zu bestehen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Die in dieser Arbeit untersuchten extrazellulären Polysaccharide (EPS) wurden in vitro durch orale Streptokokken synthetisiert, die teils von GEHRING aus Plaque oder kariösen Läsionen von Patienten der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten, Würzburg, isoliert und teils von anderen Autoren zur Verfügung gestellt worden waren. Verwendet wurden vier Stämme der Art Streptococcus mutans mit der Bezeichnung S. 227, S. 441, S. 631 und S. 637, vier Stämme der Art Streptococcus sanguis (S.601, S. 602, S. 603 und S. 604) sowie fünf Stämme der Art Streptococcus salivarius (S. 468, S. 504, S. 594, S. 617 und S. 619).

Für die Polysaccharidgewinnung wurden Kulturen der Streptokokken in 800ml Schraubflaschen in Phenolrotbouillon (Difco) mit 5% Saccharose bei 37°C sieben Tage lang bebrütet. Die entstandenen Säuren wurden täglich mit 2N-NaOH neutralisiert (17). Nach der Bebrütung wurden Bakterien und unlösliches EPS bei 4°C abzentrifugiert, mehrfach mit Wasser ausgewaschen und gefriergetrocknet. Es wurde bewußt auf eine weitere Reinigung der EPS verzichtet, um die Gefahr des Verlustes bestimmter Polysaccharidfraktionen zu vermeiden. Die in dieser abzentrifugierten Fraktion enthaltenen EPS werden als "wasserunlösliche EPS" bezeichnet (41). Als Vergleichspolysaccharid wurde ein Lineardextran (Dextran T 2000, Pharmacia, Uppsala) in die Untersuchungen einbezogen.

Bei den verwendeten Enzymen handelte es sich um fünf

Dextranasepräparate verschiedener Firmen:

Dextranase A: Dextranase CB; 55 U/mg
bacterial lyophilized powder
Calbiochem, San Diego

Dextranase B: Dextranase; 64 U/mg
crude Dextranase from Penicillium spec.
Worthington Biochemical Corporation
San Francisco

Dextranase C: Dextranase 440618
Nagase Enzymes, Japan
(keine weiteren Angaben)

Dextranase D: Dextranase Usher 1000; 100 U/mg
Source: Penicillium spec.
Dextran Products Ltd, Scarborough

Dextranase E: Dextranase; 28 U/mg
crude powder from Penicillium spec.
Sigma Chemicals Corp., St. Louis

2.2. Methoden

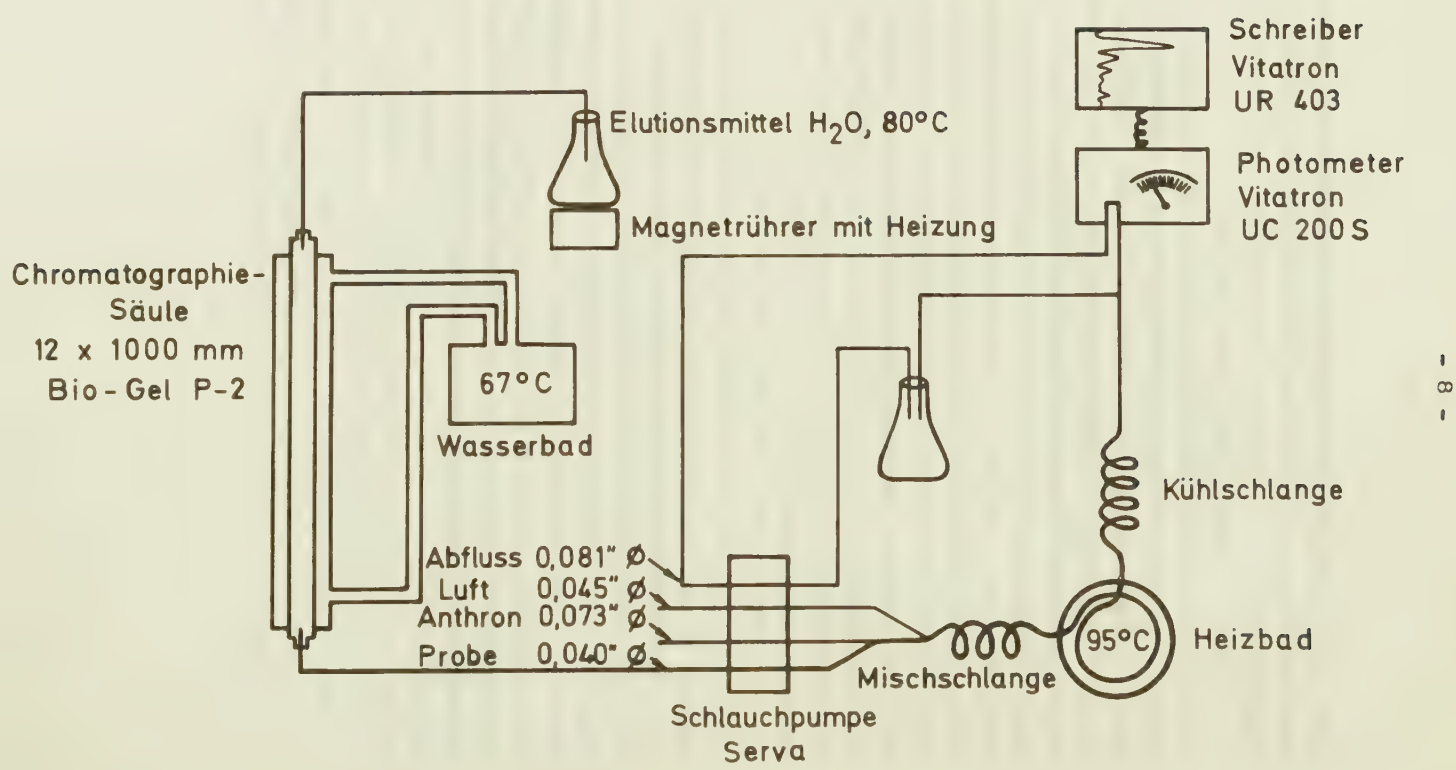
Die wasserunlöslichen EPS der obengenannten Stämme wurden in 0,2M Natriumacetatpuffer bei pH 5,4 und 37°C im Wasserbad eine Stunde lang mit den verschiedenen Dextranasepräparaten inkubiert. Die Konzentration an EPS betrug 1 mg/ml, die Enzymkonzentration 0,5 mg/ml. Entsprechende Ansätze wurden auch mit Dextran T 2000 hergestellt. Durch Eintauchen der Inkubationsröhrchen in kochendes Wasser für 2 bis 3 Minuten wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend

wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert und der Überstand bis zur Durchführung der Analyse bei -18°C eingefroren.

Der im Überstand enthaltene Anteil an löslichen Kohlenhydraten wurde nach der von MORRIS (36) und TREVELYAN et al. (42) beschriebenen Anthron-Methode im Auto-Analyzer ermittelt. Dieser Kohlenhydratgehalt setzt sich zusammen aus: 1) den durch Enzymeinwirkung zu löslichen Bruchstücken abgebauten EPS, 2) dem auch ohne Enzymeinwirkung löslichen Anteil der EPS, 3) einer eventuell vorhandenen Anthron-positiven Substanz des Enzympräparates. Um die unter 2) und 3) angegebenen Anteile zu ermitteln, die zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen würden, wurden Blindproben ohne Enzym bzw. ohne Substrat inkubiert und die entsprechenden Analysenwerte vom eigentlichen Versuchswert abgezogen.

Zur Ermittlung der Molekülgröße der Hydrolysenprodukte wurden die im Überstand enthaltenen löslichen Anteile mittels Säulenchromatographie an Bio-Gel P-2 fraktioniert (12, 26). Die quantitative Bestimmung der einzelnen Fraktionen erfolgte mit der Anthronmethode im Durchflußphotometer und Auswertung der einzelnen Peaks mittels Integrator. In Abbildung 1 ist der Aufbau der verwendeten Apparatur skizziert. Über die Retentionszeit und mittels Dünnschichtchromatographie können die Peaks identifiziert werden (40).

Abbildung 1 Skizze der Apparatur



3. Ergebnisse

Die Versuche wurden in vier Gruppen eingeteilt. Zunächst wurde die Wirksamkeit der Dextranasepräparate gegenüber Dextran T 2000 bei unterschiedlich langen Inkubationszeiten ermittelt. Als Maß für die Wirksamkeit der verschiedenen Enzympräparate diente u.a. die durch enzymatische Hydrolyse freigesetzte Menge an Isomaltose. In drei weiteren Versuchsgruppen wurde die Angreifbarkeit der extrazellulären Polysaccharide einiger Stämme von Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis und Streptococcus salivarius durch die verschiedenen Dextranasen untersucht. Hier wurde als Maß für die Wirksamkeit der Enzyme nicht die Menge eines bestimmten Hydrolysenproduktes, z.B. Isomaltose, genommen, sondern die Gesamtmenge der gebildeten wasserlöslichen Produkte.

3.1. Enzymatische Hydrolyse von Dextran T 2000

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle I zusammengefaßt. Die Dextranasepräparate A, B und D hydrolysierten das Dextran bereits innerhalb 10 - 15 min. vollständig zu Hydrolyseprodukten mit weniger als 8 Glukoseresten im Gegensatz zum Präparat C, das auch nach langdauernder Inkubation noch erhebliche Mengen von Molekülen mit mehr als 8 Glukoseresten übrig ließ. Isomaltose wurde rasch und in erheblichen Mengen nur durch die Präparate B und D freigesetzt, während Präparat A nur schwache und C gar keine Wirkung zeigte. Die Freisetzung von Isomaltose und Glukose - den typischen Endprodukten der Einwirkung einer Dextranase auf ein Dextran - ist in Abbildung 2 nochmals graphisch dargestellt. Chromatogramme der gelchromatographischen Fraktionierung der Hydrolysenprodukte sind in Abbildung 3 wiedergegeben.

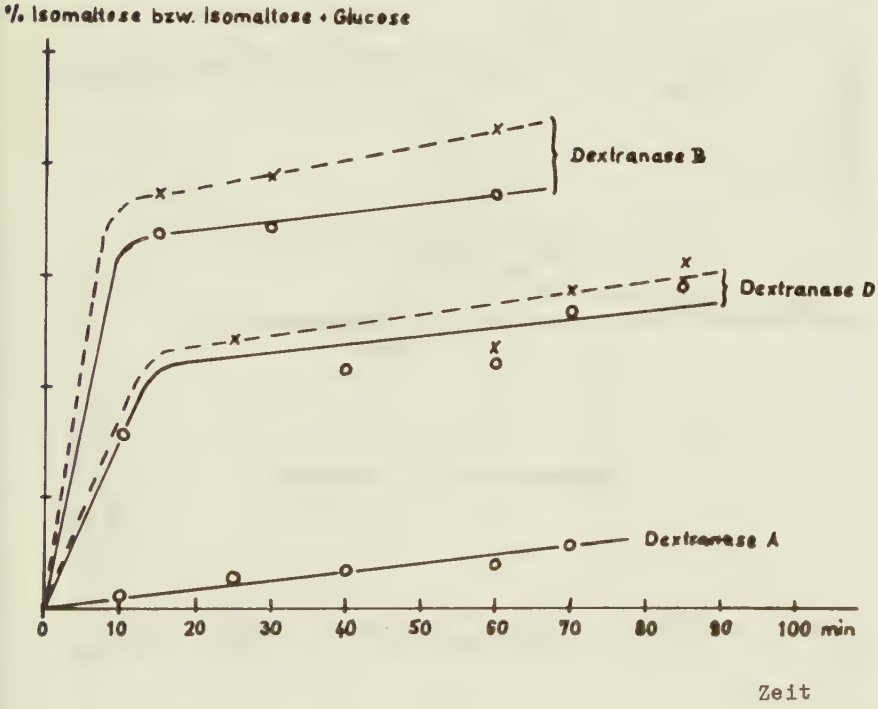
Tabelle I Anteile verschiedener Hydrolysenprodukte nach enzymatischer Hydrolyse von Dextran T 2000 mit Dextranasen

	Dextranase A				Dextranase B				Dextranase C				Dextranase D			
Zeit	Fläche der Peaks in Prozent der Gesamtfläche															
	1	2-5	6	7	1	2-5	6	7	1	2-5	6	7	1	2-5	6	7
10	0	98,2	1,8	0					87	13	0	0	15,1	53,1	31,8	0
15					0	25,3	67,7	7								
25	0	93,2	5,7	0					65,7	34,3	0	0	0	51,9	47,2	0,9
30					0	22,9	68,6	8,5								
40	0	93	7	0					52,6	47,4			3,5	53,5	43	0
60	0	91,4	8,1	0,5	0	13	74,8	12,2	51,2	48,8	0	0	3,5	49,1	44,3	3,1
70	0	93	7	0					31,2	68,8	0	0	0	42,8	53,8	3,4
85	0	90,9	9,1	0					23,4	76,6	0	0	0	37,6	58,2	4,2
100	0	92,4	7,6	0					46,6	53,4	0	0	0	37,8	58,7	3,5

Zeit: Inkubationszeit in Minuten
Fläche der Peaks in % der Gesamtfläche nach gelchromatographischer Fraktionierung des Hydrolysats. Siehe Abbildung 3
Peak 1 : Moleküle mit mehr als 8 Glukoseresten
Peak 2-5 : Moleküle mit 8 - 3 Glukoseresten
Peak 6 : Isomaltose
Peak 7 : Glukose

Abbildung 2 Freisetzung von Isomaltose und Glucose aus Dextran T 2000 durch enzymatische Hydrolyse mit Dextranasen

o - o % Isomaltose
x - x % Isomaltose + Glucose

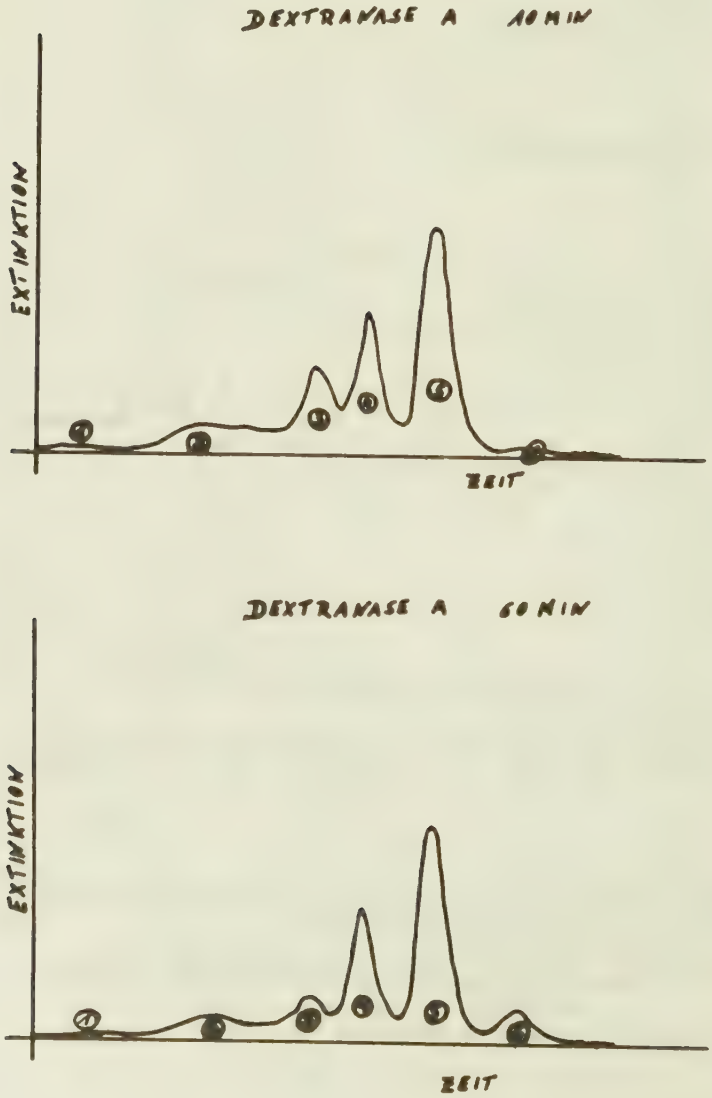


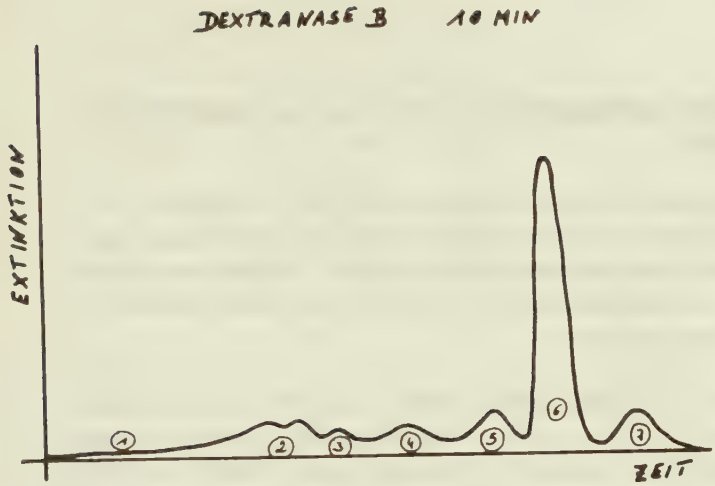
% Isomaltose: Anteil der Isomaltose an der Gesamtmenge der Hydrolysenprodukte

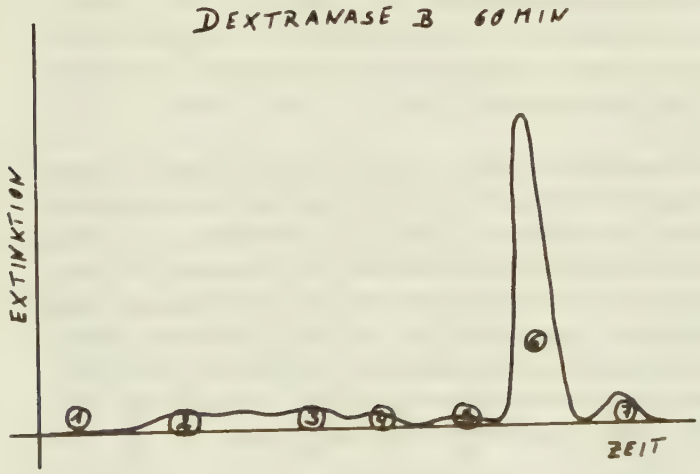
% Isomaltose + Glucose: Anteil von Isomaltose plus Glucose an der Gesamtmenge der Hydrolysenprodukte

Zeit: Inkubationszeit in Minuten

Abbildung 3 Gelchromatographische Trennung enzymatischer Hydrolysenprodukte von Dextran T 2000 an Bio-Gel P-2







Säule: 100 x 0,6 cm; Elutionsmittel: Wasser, ml/min.; Temperatur: 67°C;
Die Fläche der Peaks entspricht den Mengen folgender Hydrolysenprodukte: Peak 1: 8 Glucosereste; Peak 2: 6-8 Glucosereste; Peak 3: Pentasaccharid; Peak 4: Tetrasaccharid; Peak 5: Isotriomaltose; Peak 6: Isomaltose; Peak 7: Glucose

3.2. Enzymatische Hydrolyse der EPS von Streptococcus mutans

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle II zusammengefaßt, in Abbildung 4 sind Chromatogramme der gelchromatographischen Fraktionierung von EPS des Stammes 637 nach Inkubation mit den Dextranasepräparaten B bzw. E wiedergegeben.

Aus Tabelle II geht hervor, daß der Anteil des wasserunlöslichen EPS, der zu löslichen Produkten abgebaut wurde, mit Abbauraten zwischen 1% und 86% außerordentlich stark variierte. Dabei läßt sich eine gewisse Reihenfolge im Maß des Abbaus zu löslichen Produkten erkennen: EPS 441 > EPS 631 > EPS 227 > EPS 637. Unterschiede in der Wirksamkeit der einzelnen Enzympräparate traten nicht so klar hervor, insgesamt jedoch entfalteten die Präparate B, D und E eine stärkere hydrolytische Wirksamkeit als Dextranase A, das Enzympräparat C war nur wenig aktiv.

Sehr unterschiedlich waren auch die Anteile der einzelnen Hydrolysenprodukte nach Inkubation mit den verschiedenen Dextranasen. Den höchsten Anteil an Produkten mit mehr als 8 Glukoseresten wies stets das EPS des Stammes 227 auf, den geringsten das des Stammes 631. Größere Mengen Isomaltose entstanden regelmäßig nur bei der Inkubation des EPS 441. Das Dextranasepräparat C unterschied sich von allen anderen Präparaten dadurch, daß es aus keinem der vorgelegten EPS Isomaltose abspalten konnte.

Tabelle II Anteile verschiedener Hydrolysenprodukte nach enzymatischer Hydrolyse der extrazellulären Polysaccharide von S. mutans mit Dextranasen

EPS	Dextranase A					Dextranase B					Dextranase C					Dextranase D					Dextranase E				
	% lösl.	% Peakfläche 1	2-5	6	7	% lösl.	% Peakfläche 1	2-5	6	7	% lösl.	% Peakfläche 1	2-5	6	7	% lösl.	% Peakfläche 1	2-5	6	7	% lösl.	% Peakfläche 1	2-5	6	7
S.227	32,5	81	13	4	2	30,2	70	22	5	3	4,3	60	40	0	0	23,9	68	22	7	3					
S.441	41	17	58	15	10	73,5	0	67	24	9	32,6	49	51	0	0	86,3	37	43	15	5	30	0	54	32	14
S.631	25,3	2	95	3	0	52,3	11	66	16	7	13,4	39	61	0	0	40,8	3	72	19	8	43,9	0	75	16	9
S.637	20,6	23	70	3	4	12,4	0	41	21	32	1	0	100	0	0	22,8	30	50	10	10	65,9	40	45	10	5

% lösl.: % des während 30 min. Inkubation zu löslichen hydrolysierten wasserunlöslichen EPS

% Peakfläche: Fläche der Peaks in % der Gesamtfläche nach gelchromatographischer Fraktionierung des Hydrolysats. Siehe Abbildung 4

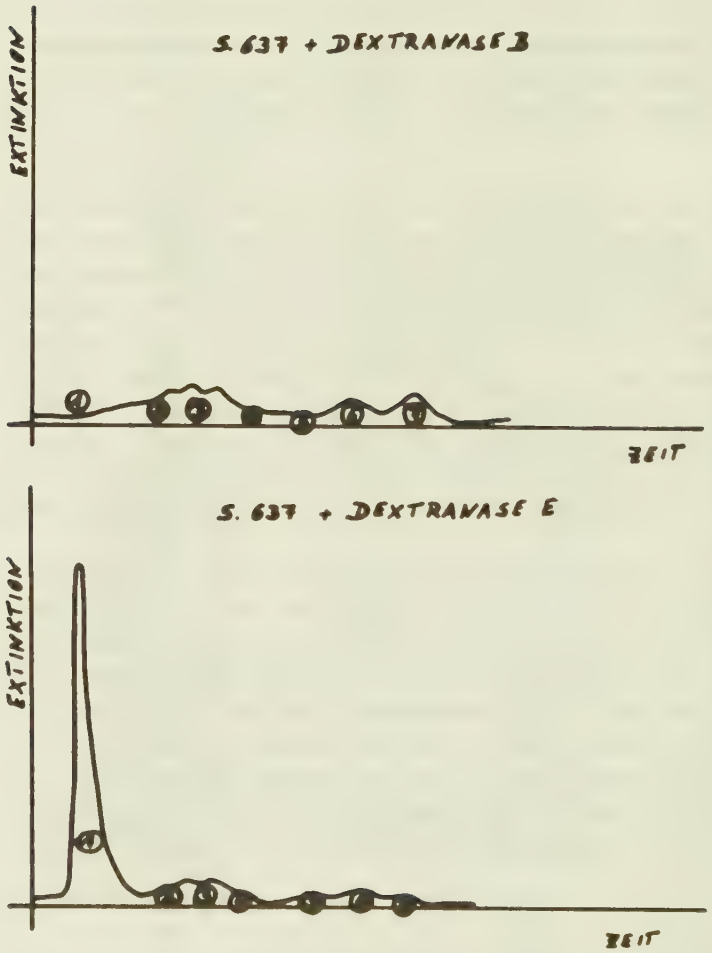
Peak 1 : Moleküle mit mehr als 8 Glukoseresten

Peak 2-5: Moleküle mit 8 - 3 Glukoseresten

Peak 6 : Isomaltose

Peak 7 : Glukose

Abbildung 4 Gelchromatographische Trennung enzymatischer Hydrolyseprodukte von S. mutans EPS an Bio-Gel P-2



Säule: 100 x 0,6 cm; Elutionsmittel: Wasser
Temperatur: 67°C;
Die Fläche der Peaks entspricht den Mengen folgender Hydrolysenprodukte: Peak 1: 8 Glucosereste; Peak 2: 6-8 Glucosereste; Peak 3: Pentasaccharid; Peak 4: Tetrasaccharid; Peak 5: Isotriomaltose; Peak 6: Isomaltose; Peak 7: Glucose

3.3. Enzymatische Hydrolyse der EPS von Streptococcus sanguis

Tabelle III faßt sämtliche Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe zusammen und Abbildung 5 zeigt die Chromatogramme vom EPS des Stammes 603 nach enzymatischer Hydrolyse mit Dextranase B bzw. C.

Der Anteil des zu löslichen Produkten hydrolysierten wasserunlöslichen EPS war hoch, er betrug zwischen 56% und 90%. Auch bei diesen EPS ist eine Reihenfolge in der Angreifbarkeit durch Dextranasen vorhanden. Am stärksten wurde das EPS 603 abgebaut, in geringerem Ausmaß EPS 602 sowie EPS 604 und am wenigsten das EPS 601. Die vier Enzympräparate unterschieden sich in ihrer Fähigkeit zur Bildung löslicher Hydrolysenprodukte nur geringfügig voneinander.

Aus allen EPS entstanden durch einstündige Inkubation mit Dextranasen überwiegend Hydrolysenprodukte mit weniger als 8 Glukoseresten, außer bei Inkubation mit dem Präparat C. Die Dextranasen B und D setzten aus allen EPS erhebliche Mengen Isomaltose frei, während durch Dextranase A überwiegend Saccharide mit 3 - 8 Glukoseresten gebildet wurden. Nach Inkubation mit Dextranase C wiesen etwa zwei Drittel der Hydrolysenprodukte mehr als 8 Glukosereste auf und ein Drittel 3 - 8 Glukosereste. Im Gegensatz zu allen anderen Enzympräparaten wurde jedoch keinerlei Isomaltose freigesetzt.

Tabelle III Anteile verschiedener Hydrolysenprodukte nach enzymatischer Hydrolyse der extrazellulären Polysaccharide von S. sanguis mit Dextranasen

EPS	Dextranase A					Dextranase B					Dextranase C					Dextranase D				
	% lösl.	% Peakfläche 1	2-5	6	7	% lösl.	% Peakfläche 1	2-5	6	7	% lösl	% Peakfläche 1	2-5	6	7	% lösl.	% Peakfläche 1	2-5	6	7
S.601	70,9	6	87	7	0	66,4	0	61	30	9	72,3	64	36	0	0,5	63	17	66	14	3
S.602	77,6	1	90	9	0	86,5	0	67	26	7	81,2	66,5	33,5	0	0	56	23	55	20	2
S.603	89,8	2	96	2	0	90,8	35	51	11	2	82,3	68	32	0	0	90,5	6	79	15	0
S.604	82,5	0	94	6	0	86,3	0	60	30	10	60,6	62,5	37,5	0	0	78,8	10	69	19	2

% lösl.: % des während 30 min. Inkubation zu löslichen hydrolysierten wasserunlöslichen EPS

% Peakfläche: Fläche der Peaks in % der Gesamtfläche nach gelchromatographischer Fraktionierung des Hydrolysats. Siehe Abbildung 5

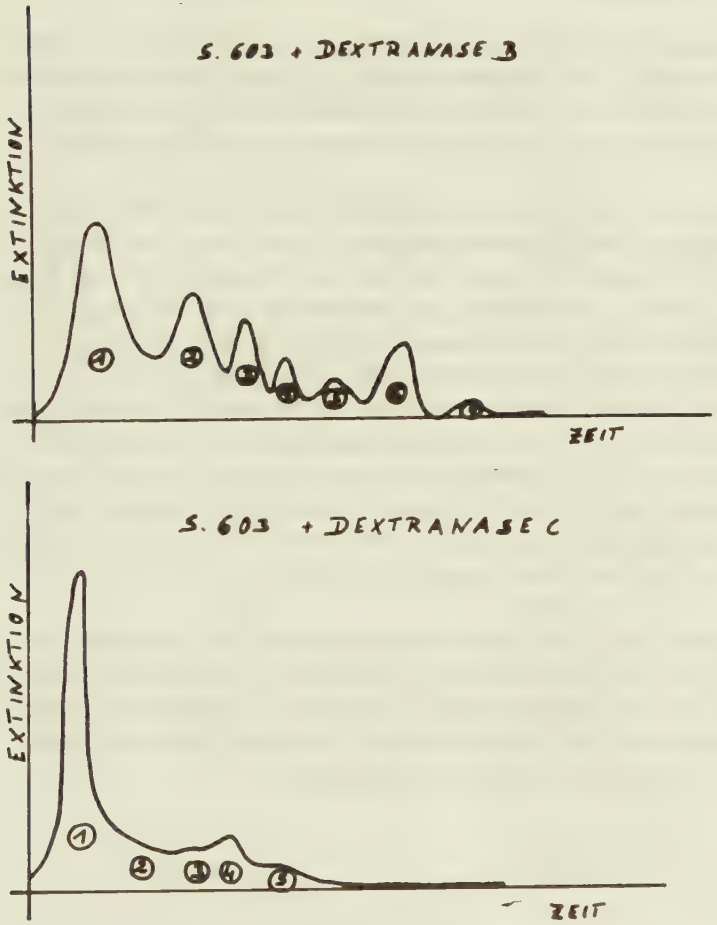
Peak 1 : Moleküle mit mehr als 8 Glukoseresten

Peak 2-5: Moleküle mit 8 - 3 Glukoseresten

Peak 6 : Isomaltose

Peak 7 : Glukose

Abbildung 5 Gelchromatographische Trennung enzymatischer Hydrolyseprodukte von S. sanguis EPS an Bio-Gel P-2



Säule: 100 x 0,6 cm; Elutionsmittel: Wasser, Temperatur: 67°C;
Die Fläche der Peaks entspricht den Mengen folgender Hydrolysenprodukte: Peak 1: 8 Glucosereste; Peak 2: 6-8 Glucosereste; Peak 3: Pentasaccharid; Peak 4: Tetrasaccharid; Peak 5: Isotriomaltose; Peak 6: Isomaltose; Peak 7: Glucose

3.4. Enzymatische Hydrolyse der EPS von Streptococcus salivarius

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle IV zusammengestellt, ein Chromatogramm der gelchromatographischen Fraktionierung vom EPS des Stammes 504 mit den Dextranasepräparaten A bzw. B ist in Abbildung 6 wiedergegeben.

Der Anteil der durch Dextranaseeinwirkung zu löslichen Produkten hydrolysierten EPS variierte zwischen 3% und 87%. Am stärksten wurde das EPS des Stammes 504 angegriffen, deutlich schwächer die EPS der Stämme 594 und 617, während die EPS der Stämme 468 und 619 eine Mittelstellung einnahmen. Große Unterschiede bestanden in der hydrolysierenden Wirkung der vier Dextranasen gegenüber den EPS von S. salivarius: die Präparate A und B wandelten durchschnittlich 60% der wasserunlöslichen EPS in lösliche Produkte um und das Präparat D etwa 30%, während durch Einwirkung der Dextranase C nur wenige Prozent der vorgelegten EPS in Lösung gebracht wurden.

Die Hydrolysenprodukte bestanden in 18 der 20 Versuche zu über 55% aus Molekülen mit mehr als 8 Glukoseresten; Isomaltose und Glukose wurden höchstens in minimalen Mengen freigesetzt. In dieser Hinsicht unterschieden sich die vier Enzympräparate kaum voneinander.

Tabelle IV Anteile verschiedener Hydrolyseprodukte nach enzymatischer Hydrolyse der extrazellulären Polysaccharide von S. salivarius mit Dextranasen

EPS	Dextranase A					Dextranase B					Dextranase C					Dextranase D				
	% lösl.	% Peakfläche 1	2-5	6	7	% lösl.	% Peakfläche 1	2-5	6	7	% lösl.	% Peakfläche 1	2-5	6	7	% lösl.	% Peakfläche 1	2-5	6	7
S.468	71,2	57	39	1	3	70,1	75	19	33	3	3,4	22	78	0	0	33,3	89	10	0	1
S.504	87,7	82	14	0	4	85,6	69	24	5	2	3,8	18	82	0	0	45,1	97	3	0	0
S.594	38,4	78	20	0	2	39,6	64	29	4	4	4	76	24	0	0	19,3	97	3	0	0
S.617	50	87	9	3	2	32	55	35	6	4	18,5	89	11	0	0	12,3	58	34	5	3
S.619	52,8	75	21	0	4	54,2	75	23	0	2	10,7	73	20	0	7	39	75	20	0	5

% lösl.: % des während 30 min. Inkubation zu löslichen hydrolysierten wasserunlöslichen EPS

% Peakfläche: Fläche der Peaks in % der Gesamtfläche nach gelchromatographischer Fraktionierung des Hydrolysats. Siehe Abbildung 5

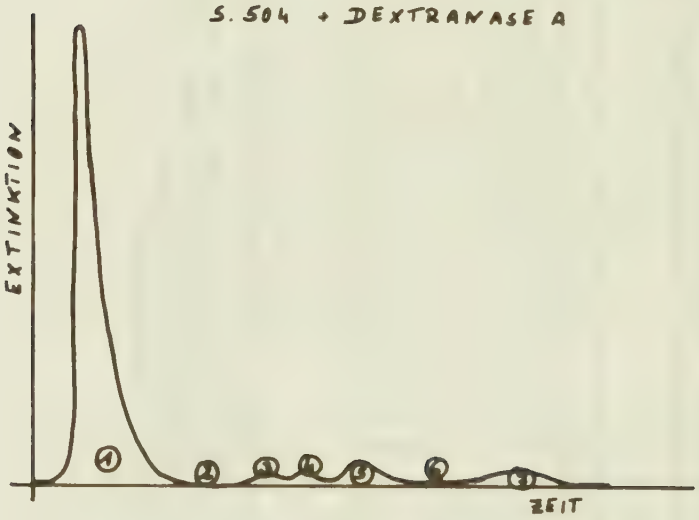
Peak 1 : Moleküle mit mehr als 8 Glukoseresten

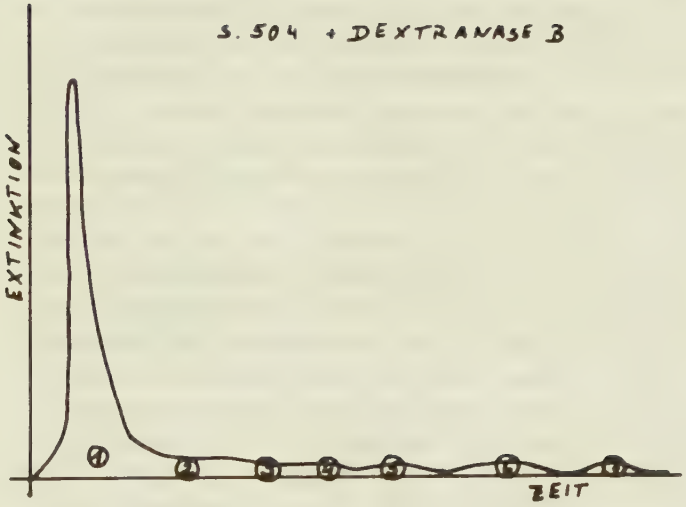
Peak 2-5: Moleküle mit 8 - 3 Glukoseresten

Peak 6 : Isomaltose

Peak 7 : Glukose

Abbildung 6 Gelchromatographische Trennung enzymatischer Hydrolyseprodukte von S. salivarius EPS an Bio-Gel P-2





Säule: 100 x 0,6 cm; Elutionsmittel: Wasser
Temperatur: 67°C;
Die Fläche der Peaks entspricht den Mengen folgender Hydrolysenprodukte: Peak 1: 8 Glucosereste; Peak 2: 6-8 Glucosereste; Peak 3: Pentasaccharid; Peak 4: Tetrasaccharid; Peak 5: Isotriomaltose; Peak 6: Isomaltose; Peak 7: Glucose

4. Diskussion

4.1. Enzymatische Hydrolyse von Dextran T 2000

Bevor man breitangelegte Untersuchungen mit Dextranasepräparaten durchführt, wäre es günstig, eine gewisse "Vorzensur" unter den vorhandenen Produkten zu treffen, um krasse "Versager" von vornherein ausschließen zu können. Am einfachsten wäre eine solche Auswahl anhand der von den Herstellern angegebenen Enzymaktivitäten.

In einer ersten Versuchsreihe mit Dextran T 2000 wurde deshalb geprüft, wie weit diese Angaben der Hersteller auch unter den von uns benutzten Versuchsbedingungen gültig sind. Als Maß für die Aktivität diente die Menge der durch Enzymeinwirkung freigesetzten Isomaltose. Wie aus Tabelle I hervorgeht, konnten keine Übereinstimmungen zwischen unseren Ergebnissen und den für die einzelnen Präparate angegebenen Aktivitäten gefunden werden. So erwies sich z.B. die Dextranase B (64 U/mg) gegenüber Dextran T 2000 als weitaus wirksamer als die Dextranase E 100 U/mg). Nur geringe Wirkung zeigte Präparat A (55 U/mg) und als völlig unwirksam, Isomaltose abzuspalten, erwies sich Dextranase C.

Diese Ergebnisse scheinen zunächst irritierend. Doch nach BÖSSMANN und BARTSCH (2) differieren die Reaktionsoptima für Dextranasen unterschiedlicher Herkunft; in dieser Arbeit wurden jedoch einheitliche Versuchsbedingungen angewandt, die sich für früher getestete Dextranasen bewährt hatten (40). Ferner muß für die Bestimmung von Enzymaktivitäten Substratüberschuß vorhanden sein; bei dem in dieser Arbeit verfolgten Ziel - rascher Abbau von extrazellu-

lären Polysacchariden - muß dagegen die Enzymmenge möglichst groß sein. Theoretisch hätten die eingesetzten Enzymmengen ausgereicht, die vorgelegte Menge Dextran in weniger als einer Minute vollständig in Isomaltose zu spalten. Der nicht-geradlinige Verlauf der Freisetzung von Isomaltose bei der Inkubation mit Dextranase B und E ist ein typisches Zeichen zunehmenden Substratmangels.

An Hand der Säulenchromatogramme dieser Versuchsreihe mit Dextran T 2000 lassen sich Aufschlüsse über die Wirkungsmechanismen der verwendeten Enzyme gewinnen. Vergleicht man nämlich die nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten erhaltenen Chromatogramme miteinander, so kann man deutlich eine Verschiebung des Anteils an höhermolekularen Spaltprodukten zugunsten von Isomaltose und Glucose beobachten (s. Tabelle I).

Dieses Bild erinnert an den Abbau von Stärke durch α-Amylase (28). Wenn auch die Art der gelösten Bindungen unterschiedlich ist, der Reaktionsmechanismus dürfte ähnlich sein: Zunächst werden Glykosidbindungen innerhalb der Kette gespalten, dadurch entstehen Oligosaccharide (Peak 2 - 5) und höhermolekulare Bruchstücke. Bei längerer Einwirkungszeit werden diese Hydrolyseprodukte weiter abgebaut, bis schließlich Isomaltose und aus den ungeradezähligen Bruchstücken zusätzlich Glucose gefunden werden.

Analog zur α-Amylase muß man also die von uns verwendeten Dextranasen als Endodextranasen bezeichnen.

4.2. Enzymatische Hydrolyse der EPS von Streptococcus mutans

Keines der getesteten Enzympräparate war in der Lage, wasserunlösliche EPS von S. mutans vollständig in lösliche Produkte umzuwandeln. Im günstigsten Fall wurden 86% der eingesetzten Polysaccharidmenge in Lösung gebracht, im ungünstigsten Fall nur 1% (Tabelle II). Versuche mit einer Einwirkungszeit des Enzyms von 24 Stunden zeigen, daß diese unvollständige Hydrolyse nicht auf eine zu kurze Inkubationszeit zurückzuführen ist, denn auch nach 24 Stunden waren die EPS nicht vollständig abgebaut. So wurden vom EPS des Stammes 631 während einer Stunde Inkubation 25% zu löslichen Produkten hydrolysiert und eine Verlängerung der Inkubationszeit erhöhte diesen Anteil nicht. Beim EPS des Stammes 441 stieg zwar die Menge an Spaltprodukten von 41% nach einer Stunde Inkubation auf 60% nach 24 Stunden, doch steht diese Zunahme in keinem Verhältnis zur Verlängerung der Enzymeinwirkung.

Die Wirksamkeit eines jeden Dextranasepräparates zeigt starke Unterschiede gegenüber den EPS der verschiedenen Stämme (Tabelle II). Keines der Präparate zeigte gegenüber allen EPS gleich gute Ergebnisse, keines war völlig inaktiv. Am ausgeprägtesten läßt sich dieses Verhalten bei der Dextranase ε aufzeigen, die im Vergleich mit den anderen Enzympräparaten das EPS des Stammes 637 am weitestgehenden hydrolysierte, das EPS des Stammes 441 dagegen am wenigsten abzubauen vermochte. Eine bestimmte Reihenfolge der Enzyme, bezogen auf ihre Abbauleistung, läßt sich somit nicht festlegen.

Nach den unter 4.1. diskutierten Ergebnissen der enzyma-

tischen Hydrolyse von Dextran war zu erwarten, daß auch keine Übereinstimmung zwischen den von den Herstellern angegebenen Enzymaktivitäten und den Abbauraten der EPS besteht. Bemerkenswert ist jedoch, daß auch zwischen den ermittelten Aktivitäten gegenüber Dextran und der Wirkung gegenüber den EPS von S. mutans keine Übereinstimmungen zu finden sind, trotz gleicher Versuchsbedingungen in beiden Untersuchungsreihen.

Eine Erklärung dieser Ergebnisse dürfte darin zu sehen sein, daß die Dextranasepräparate außer der Fähigkeit zur Spaltung von α-1,6-Bindungen noch sogenannte Nebenaktivitäten aufweisen, d.h. weitere Bindungstypen hydrolysieren können. Auch GUGGENHEIM (23) und NEWBRUN (38) haben mitgeteilt, daß handelsübliche Dextranasepräparate häufig in der Lage sind, auch α-1,3- und α-1,4-Bindungen anzugreifen. Solche Nebenaktivitäten machen sich naturgemäß gegenüber Dextranen nicht bemerkbar und spiegeln sich deshalb in den unter 4.1. diskutierten Ergebnissen nicht wieder. Von Bedeutung ist jedoch diese Fähigkeit bei der Hydrolyse extrazellulärer Streptokokkenpolysaccharide. Denn wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind die Streptokokkenpolysaccharide keine reinen Dextrane, wie früher angenommen wurde, sondern enthalten neben den α-1,6-gebundenen Glukoseresten auch α-1,3- und α-1,3,6-Bindungen in unterschiedlichem Ausmaß (8).

Die in dieser Arbeit mitgeteilten Werte sind ein Maß für die gesamte Abbauleistung der verwendeten Enzympräparate. Daraus ergibt sich, daß zwischen der auf die Spaltung von α-1,6-Bindungen bezogenen spezifischen Aktivität und der gesamten hydrolytischen Aktivität keine Korrelation besteht. Eine Unterscheidung, welchen Anteil an der Gesamt-

aktivität die reine Dextranasewirkung hat und wieviel Polysaccharid aufgrund der Nebenwirkungen gespalten wird, ist nach der hier benutzten Methode nicht möglich.

Die Fähigkeit der verwendeten Enzyme, auch α-1,3-Bindungen anzugreifen, reicht allein noch nicht für die Erklärung der starken Unterschiede in der Wirksamkeit gegenüber den EPS der verschiedenen S. mutans-Stämme aus. Wäre einzig der Gehalt an den Bindungstypen entscheidend, so müßten EPS mit gleichen Anteilen verschiedener Bindungen gleich stark abgebaut werden. Die hier mitgeteilten Ergebnisse zeigen aber, daß das nicht der Fall ist. So weist sowohl das EPS des Stammes 227 als auch das von Stamm 631 neben 52% α-1,6-Bindungen noch 48% α-1,3- und α-1,3,6-Bindungen auf (6). Nach enzymatischer Hydrolyse mit Dextranase B gehen jedoch 52% des EPS von Stamm 631, aber nur 30% des EPS von Stamm 227 in Lösung. Säulenchromatographisch lassen sich zudem beträchtliche Abweichungen in der Molekülgröße der Abbauprodukte nachweisen. Ähnliche Unterschiede findet man auch im Verhalten gegenüber anderen Enzympräparaten.

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß neben der Art der Bindungstypen auch deren räumliche Verteilung eine wesentliche Rolle spielt. Mittels Perjodatoxidation lassen sich nur die Mengen verschiedener Bindungsformen erhalten. Darüber, ob die α-1,3-Bindungen in Haupt- oder Seitenketten gelegen sind, oder ob es sich um α-1,3,6-Verzweigungsstellen handelt, sind keine Aussagen möglich. Von verschiedenen Autoren wird aber angenommen, daß die EPS oraler Streptokokken stark verzweigte Moleküle sind (14, 34, 3, 8).

In Anlehnung an den Mechanismus der Hydrolyse vom Amylopektin durch α-Amylase kann man auch für den Abbau von Streptokokken-EPS eine Beeinflussung durch die Verzweigungsstellen vermuten. Die Ansatzstellen der Seitenketten im Amylopektinmolekül werden durch α-Amylase nicht gespalten, sondern übersprungen, so daß u.a. verzweigte Oligosaccharide entstehen. Beim anschließenden Weiterabbau der Bruchstücke hört die enzymatische Wirksamkeit bereits vor der Verzweigungsstelle auf (28). Ähnliches beobachteten auch Weigel und Hutson (43) bei ihren Untersuchungen über das Verhalten einiger Dextranasen von Penicillium funiculosum und P. lilacinum gegenüber verzweigten Dextranen. Auf der reduzierenden Seite des Seitenkettenansatzpunktes wurden wenigstens zwei benachbarte Bindungen nicht gespalten, auf der nichtreduzierenden Seite widerstand wenigstens eine der Verzweigungsstelle benachbarte Bindung dem Angriff der Dextranase.

Eine Verallgemeinerung dieser Befunde würde bedeuten, daß die Wirksamkeit der Dextranasen um so geringer ist, je größer die Anzahl an Seitenketten und je gleichmäßiger deren Verteilung entlang der Hauptkette ist.

4.3. Enzymatische Hydrolyse der EPS von Streptococcus sanguis

Die EPS von S. sanguis wurden durch alle verwendeten Dextranasepräparate weitgehend zu wasserlöslichen Produkten hydrolysiert (Abb. 5). Die Ergebnisse der säulenchromatographischen Fraktionierung der Hydrolysenprodukte zeigen, daß ein erheblicher Anteil des Polysaccharids zu Oligosacchariden mit 3 - 8 Glukoseresten abgebaut wurde (Tab. III). Diese ausgeprägte hydrolytische Wirksamkeit der Dextranasepräparate gegenüber den EPS von S. sanguis ist durch den hohen Anteil an α-1,6-Bindungen in diesen EPS bedingt (6). Eine direkte Korrelation zwischen dem Grad des Abbaus der EPS und ihrem Gehalt an bestimmten Bindungstypen ist jedoch auch bei den EPS von S. sanguis nicht gegeben. Dieser Befund muß wiederum als ein Hinweis dafür angesehen werden, daß für den Abbau der EPS neben dem Verhältnis bestimmter Bindungstypen zueinander auch die Molekülstruktur eine Rolle spielt.

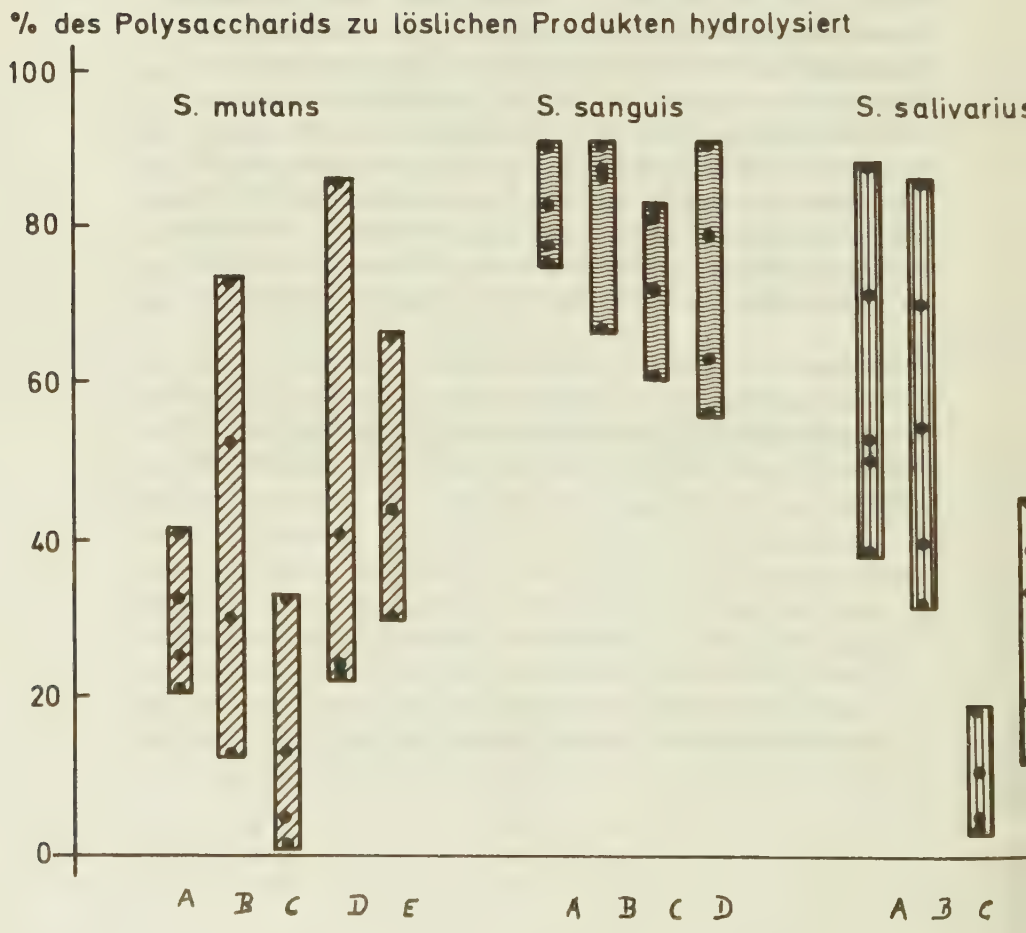
Das Dextranasepräparat C hydrolysiert die EPS von S. sanguis zu wasserlöslichen Produkten in gleichem Ausmaß wie die übrigen Dextranasepräparate, während seine Wirksamkeit gegenüber den EPS von S. mutans und S. salivarius deutlich geringer ist als die der anderen Dextranasen (Tab. III). Für diesen Unterschied in der Aktivität müssen ebenfalls die hohen Anteile typischer Dextranstrukturen in den EPS von S. sanguis verantwortlich sein. Die geringe Wirksamkeit gegenüber den EPS der beiden anderen Arten deutet darauf hin, daß das Präparat C praktisch keine Fähigkeit zur hydrolytischen Spaltung anderer Bindungen als der α-1,6-Bindungen aufweist.

4.4. Enzymatische Hydrolyse der EPS von Streptococcus salivarius

Die EPS von S. salivarius zeichnen sich im Vergleich mit den Polysacchariden der beiden anderen Arten durch einen deutlich geringeren Gehalt an α-1,6-Bindungen aus (6). Trotzdem werden einige dieser EPS durch die Dextranasen A und B in gleichem Ausmaß zu löslichen Produkten hydrolysiert wie die EPS von S. sanguis (Tab. IV). Die säulenchromatographische Fraktionierung dieser Abbauprodukte zeigt jedoch, daß die hydrolytische Spaltung wesentlich geringer ist als bei den EPS von S. sanguis, bedingt durch den hohen Anteil an nicht-α-1,6-Bindungen, denn es entstehen überwiegend Spaltprodukte mit mehr als 10 Glukoseresten. Die Dextranase C zeigt gegenüber diesen EPS mit ihrem hohen Gehalt an α-1,3-Bindungen erwartungsgemäß nur geringe Wirksamkeit, was wieder als Indiz für das Fehlen von "Nebenaktivitäten" aufgefaßt werden muß.

Auffallend ist, daß bei vier von fünf dieser EPS trotz gleicher Anteile von α-1,6-Bindungen (30 - 35%) die Abbauraten sehr stark differieren. Dieses Verhalten kann wieder nur mit strukturellen Unterschieden der EPS erklärt werden.

Abbildung 7 Enzymatischer Abbau der EPS von S. mutans, S. sanguis und S. salivarius bis zur Wasserlöslichkeit



4.5. Schlußfolgerungen für eine Verwendung polysaccharidspaltender Enzyme in der Kariesprophylaxe

Im Laufe des letzten Jahrzehnts wurden zahlreiche Untersuchungen über die Möglichkeiten eines Einsatzes polysaccharidspaltender Enzyme als Mittel einer Kariesprophylaxe durchgeführt (7, 29, 30, 31, 35, 37, 39). Trotz der meist negativen Resultate der bisherigen klinischen Studien werden weitere Experimente auf diesem Gebiet als notwendig und sinnvoll erachtet. FROSTELL und ERICSSON (16) schreiben dazu: "The effect of different enzymes and enzyme combinations against dental plaque seems to have been inadequately studied so far and this may be a promising field for further investigations". Und in einer kürzlich erschienenen Übersichtsarbeit "A biochemical approach to the control of dental caries" kommt COLE (9) zu folgendem Schluß: "A major biochemical contribution to the ultimate control of caries would therefor be the characterization of enzymes that ... degrade these insoluble polymers". In diesem Sinn wurden die hier vorgelegten Untersuchungen durchgeführt, die an frühere Versuche von SCHMIDT et al. (40) anknüpfen. SCHMIDT prüfte die Wirksamkeit mehrerer Dextranasepräparate aus P. funiculosum gegenüber den EPS je eines Stammes von S. mutans und S. sanguis. Diese Präparate waren als Versuchsmuster von zwei Firmen zur Verfügung gestellt worden. Inzwischen bieten mehrere Firmen in ihren Chemikalienprogrammen Dextranasen an, darunter auch ein aus Bakterien gewonnenes Enzym, und es besteht großes Interesse, auch solche kommerziellen Präparate auf ihre Wirksamkeit gegenüber einem breiten Spektrum von EPS oraler Streptokokken zu testen.

Die dominierenden Streptokokkenarten der Plaqueflora sind S. sanguis und S. mutans, und die von ihnen synthetisierten EPS spielen nach dem heutigen Stand der Kenntnisse eine wichtige Rolle bei der Plaquebildung sowie bei der Haftung der Bakterien an der Zahnoberfläche (13, 17, 24). Die Art S. salivarius als vorherrschende Keimart im aeroben Speichelsystem spielt zwar in den Plaque nur eine höchst untergeordnete Rolle, doch da unbekannt ist, ob und wie weit wasserunlösliche Polysaccharide dieser Art in die Plaque integriert werden können, wurden EPS von S. salivarius mit in unsere Untersuchungen einbezogen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzympräparate zeigen gegenüber den EPS von S. sanguis eine recht starke und gleichmäßige Wirksamkeit, wie Abb. 7 veranschaulicht. Deshalb könnten sie als potentiell geeignet erscheinen, in einem tierexperimentellen oder klinischen in vivo Versuch auf ihre plaquereduzierende oder kariesprotektive Wirkung hin getestet zu werden. Dem steht jedoch die sehr ungleichmäßige und insgesamt schwache Wirkung gegenüber, die sie auf die EPS von S. mutans und S. salivarius ausüben. Entsprechende Unterschiede in der Fähigkeit, wasserunlösliche EPS der beiden Spezies S. mutans und S. sanguis zu wasserlöslichen Produkten zu hydrolysieren, hatten auch NEWBRUN (38) sowie SCHMIDT (40) et al. beobachtet. Der Grund dafür muß in strukturellen Unterschieden zwischen den EPS der beiden Arten gelegen sein und zwar vor allem in den höheren Anteilen der α-1,6-gebundenen Glukosereste in den EPS von S. sanguis, denn nur diese können durch Dextranasen hydrolytisch gespalten werden. Es konnte jedoch keine enge Korrelation zwischen dem Anteil an diesem Bindungstyp im EPS und der hydrolytischen Wirksamkeit der einzelnen Dextranasepräparate gefunden

werden. Dafür dürften weitere strukturelle Unterschiede zwischen den EPS mitverantwortlich sein - wie z.B. der Grad der Verzweigung des Moleküls und die Lage der verschiedenen Bindungen im Molekül - die ebenfalls die Angreifbarkeit durch Dextranase beeinflussen. Ferner wurde schon früher von GUGGENHEIM (22) sowie von SCHMIDT et al. (40) darauf hingewiesen, daß in Dextranasepräparaten wahrscheinlich Begleitenzyme mit der Fähigkeit zur Lösung weiterer Bindungstypen vorkommen. Durch die Annahme derartiger Nebenaktivitäten ließe sich auch die unterschiedliche Wirkung eines Dextranasepräparates gegenüber den verschiedenen EPS leichter erklären. Etwas überspitzt könnte man folgendermaßen formulieren: je reiner eine Dextranase, desto ungeeigneter erscheint sie für den Einsatz in der Kariesprophylaxe.

Auch die starken Unterschiede in der Wirksamkeit der Dextranasepräparate gegenüber den EPS der verschiedenen Stämme sind ein starkes Indiz für die Annahme, daß man wohl kaum ein Dextranasepräparat wird darstellen können, das die EPS verschiedener Stämme unterschiedlicher Arten gleich wirksam zu hydrolysieren vermag. Vielmehr muß aus diesen eigenen wie auch aus den Untersuchungen anderer Autoren (23, 30) der Schluß gezogen werden, daß für den Abbau unlöslicher EPS in den Plaque eine Kombination mehrerer Enzyme mit den Fähigkeiten zur Hydrolyse unterschiedlicher Strukturen größere Aussicht auf Erfolg verspricht.

Alle bisher durchgeführten klinischen Untersuchungen über die Wirkung EPS-abbauender Enzyme auf die Plaqueentwicklung waren Kurzzeitversuche über jeweils nur wenige Tage. Sie konnten deshalb keine Antwort geben auf die Frage, ob

bei einer langdauernden oder ständigen Anwendung solcher Enzyme belästigende oder gar den Organismus schädigende Nebenwirkungen auftreten können, die nach den Befunden von BOWEN (4) nicht auszuschließen sind. Dieser Autor fand bei Versuchen mit Affen, die sich über drei Jahre erstreckten, daß regelmäßige niedrige wie auch einmalige hohe Dosen von Dextranase eine signifikante Reduzierung der Zahl weißer Blutkörperchen hervorrief. Es ist jedoch anzunehmen, daß dieses Symptom nicht durch das Enzym selber, sondern durch unbekannte Begleitsubstanzen dieses Präparates hervorgerufen wurde, denn andere Autoren konnten weder bei Ratten (23, 25) noch beim Menschen (30) nach Applikation von Dextranasen verschiedener Herkunft oder von α-1,3-Glucanhydralasen (Mutanasen) eine Beeinflussung der weißen Blutkörperchen feststellen. Auch die nach oralen Gaben von Mutanase (30) beobachteten lokalen Nebenwirkungen wie Zungenbluten, Geschmacksirritation u.a.m. wurden von den Autoren mit der Anwesenheit von Proteasen in dem Mutanasepräparat in Zusammenhang gebracht. In anderen Untersuchungen (31, 35) berichteten die Probanden, daß sie keinerlei belästigende Nebenwirkungen nach Dextranasegaben beobachten konnten.

Wie frühere Versuche ergeben haben (40), vermögen Dextranasepräparate in vitro innerhalb weniger Minuten erhebliche Anteile wasserunlöslicher EPS zu löslichen Produkten abzubauen. Dennoch werden in vivo derart kurze Einwirkungszeiten kaum sinnvoll sein, weil die großen Enzymmoleküle nicht in die Plaque eindringen und ihre Wirkung nur gegenüber EPS-Molekülen an der Plaqueoberfläche entfalten können. Für eine praktische Anwendung muß deshalb sichergestellt werden, daß die EPS genügend Zeit zur Einwirkung haben oder aber, daß sie in der Mundhöhle vor-

handen sind, bevor sich noch eine ausgedehnte und festhaftende Plaqueschicht hat bilden können.

In Tierexperimenten wurde in der Regel die zweite Möglichkeit gewählt und die zu prüfenden Enzyme dem Futter der Tiere beigegeben. Somit wurden die EPS-Moleküle gleich "in statu nascendi" angegriffen und es konnten keine größeren Mengen wasserunlöslicher EPS als integrierender Plaquebestandteil gebildet werden. Applikation der Dextranase über das Trinkwasser, d.h. Einbringen des Enzyms in die Mundhöhle erst nach dem Beginn der Polysaccharidsynthese, zeitigte dementsprechend geringere Erfolge. Nun wird es aus verschiedenen Gründen kaum möglich sein, dem Nahrungszucker des Menschen - als dem Substrat für die bakterielle EPS-Synthese in vivo - polysaccharidabbauende Enzyme beizumengen. Zwar berichteten erste Untersucher über eine Reduktion der Plaque beim Menschen allein durch mehrmalige Mundspülungen mit Dextranaselösungen (31, 35), doch spätere Autoren konnten diese Befunde nicht bestätigen (29, 37, 39). Dagegen wurde auch in klinischen Untersuchungen eine Abnahme der Plaquemenge beobachtet, wenn das Enzym längere Zeit in der Mundhöhle wirksam sein konnte, weil es als Bestandteil eines Kaugummis (30) oder in Form einer am Zahn fixierten Tablette (37) angewandt wurde.

Eine Applikationsform, die die Enzymkonzentration in der Mundhöhle für längere Zeit auf einem genügend hohen Niveau hält, ist eine Grundvoraussetzung für eine prophylaktisch wirksame Plaquereduktion. Zahlreiche Tierversuche haben ergeben, daß auf diese Weise eine Verminderung des Kariesbefalls erzielt werden kann, und klinische Studien weisen darauf hin, daß auch die Entwicklung einer

Gingivitis durch Gaben polysaccharidabbauender Enzyme unterdrückt wird.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Wirkung von käuflichen Dextranasen auf extrazelluläre Polysaccharide, die von Streptococcus mutans, S. sanguis und S. salivarius in vitro synthetisiert wurden. Die verwendeten Enzympräparate unterscheiden sich sowohl nach der Art ihrer Gewinnung als auch nach ihrer Herkunft (Hersteller).

Hydrolisiert wurde jeweils bei einem pH von 5,4 und 37°C, Inkubationszeit 1 Stunde.

Zunächst wurden einige Dextranasepräparate an Dextran T 2000 getestet. Dabei lies sich keine Übereinstimmung zwischen von Hersteller angegebenen Aktivitäten und der Wirksamkeit der Enzyme unter den in diesem Versuch gewählten Bedingungen feststellen. Da genauere Herstellerangaben zu den einzelnen Präparaten fehlen, muß diese Differenz wohl auf unterschiedliche Untersuchungsverhältnisse zurückgeführt werden.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse lassen sich alle getesteten Präparate dem Typ der Endodextranasen zuordnen.

Stark voneinander abweichend ist das Verhalten der verwendeten Dextranasen gegenüber den Bakterienpolysacchariden. Am besten angegriffen wurden die EPS von Streptococcus sanguis, wesentlich uneinheitlicher aber insgesamt schlechter die EPS von S. mutans und S. salivarius.

Diese Beobachtungen wurden sowohl mit verschiedenem Gehalt der EPS an α-1,6- bzw. α-1,3-Bindungen erklärt als auch mit Unterschieden in der Verteilung der einzelnen Bindungstypen und Verzweigungen.

Die vorliegenden Resultate weisen ferner darauf hin, daß die käuflichen Dextranasen nicht rein sind, sondern daß außer der Fähigkeit zur Spaltung von 1,6-Bindungen noch Nebenaktivitäten vorhanden sein müssen, die zusätzlich die Lösung von 1,3-Bindungen ermöglichen.

Eine endgültige Beurteilung über die Möglichkeiten, polysaccharidspaltende Enzyme in der Kariesprophylaxe zu verwenden, ist nach den bisherigen Untersuchungen noch nicht möglich. Weitere Versuche müssen folgen.

6. Literaturverzeichnis

1. BLOCK, P.L.; DOOLEY, C.L.; HOWE, E.E.:
The Retardation of Spontaneous Periodontal Disease and the Prevention of Caries in Hamsters with Dextranase.
J. Period. 40, 105 (1968)

2. BÖSSMANN, K.; BARTSCH, S.: Experimentelle Untersuchungen über eine Dextranase von Penicillium funiculosum.
Dtsch. Zahnärztl. Z. 28, 290 (1973)

3. BOWEN, W.H.: Effects of Dextranase on Cariogenic and non Cariogenic Dextrans.
Brit. Dent. J. 124, 347 (1968)

4. BOWEN, W.H.: The Effects of Dextranase on Caries Activity in Monkeys.
Brit. Dent. J. 131, 445 (1971)

5. BRAMSTEDT, F.: Die Polysaccharidsynthese durch Plaquestreptokokken als kariesätiologisch wichtiger Faktor.
Dtsch. Zahnärzteblatt 22, 563 (1968)

6. BRAMSTEDT, F.; TRAUTNER, K.; LOHMANN, D.:
Untersuchung extrazellulärer Baktierenpolysaccharide.
SFB 92 "Biomund", Bericht 1976, 179

7. CALDWELL, R.C.; SANDHAM, H.J.; MANN, W.V.:
The effect of a dextranase mouthwash on dental plaque in young adults and children.
J. Amer. Dent. Ass. 82, 124 (1971)

8. CESKA, M.; GRANATH, K.; NORMAN, B.; GUGGENHEIM, B.:
Structural and Enzymatic Studies on Glucans Synthesized with Glycosyltransferase of Some Strains of Oral Streptococci.
Acta Chem. Scand. 26, 2223 (1972)

9. COLE, J.A.: A biochemical approach to the control of dental caries.
Biochem. Soc. Transactions 5, 1232 (1977)

10. CRITCHLEY, P.: The microbiology of dental plaque with special reference to polysaccharide transformation.
Dtsch. Zahnärztl. Z. 26, 1155 (1971)

11. DAHLQVIST, A.; KRASSE, B.; OLSSON I.; GARDELL, S.: Extracellular Polysaccharides Formed By Caries - Inducing Streptococci.
Helv. Odont. Acta 11, 15 (1967)

12. DELLWEG, H., TRENEL, G., JOHN, M., und EMEIS, C.: Gelchromatographische Bestimmung von Oligosacchariden in Würze und Bier mit Hilfe eines automatisierten Analysensystems.
Mschr. Brauerei 22, 177 (1969)

13. DE STOPPELAAR, A.D.; VAN HOUTE, J.; BACKER DIRKS, O.: The Relationship between Extracellular Polysaccharide - Producing Streptococci and Smooth Surface Caries in 13-Year-Old Children.
Caries research 3, 190 (1969)

14. EBISU, S., MISAKI, A., KATO, K., and KOTANI, S.: The structure of water-insoluble glucans of cariogenic Streptococcus mutans, formed in the absence and presence of dextranase.
Carbohydr. Res. 38, 374 (1974)

15. FITZGERALD, R.J.; KEYES, P.; STOUDT, T.; SPINELL, D.M. The effect of a dextranase preparation on plaque and caries in hamsters, a preliminary report.
J. Amer. Dent. Ass. 76, 301 (1968)

16. FROSTELL, G., and ERICSSON, A.: Anti-plaque therapeutics in caries prevention.
Caries Res. 12, Suppl. 1, 74 (1978)

17. GEHRING, F.: Extrazelluläre Polysaccharid bildende Streptokokken aus Zahnplaques und ihre Beziehung zur Zahnkaries.
Hanser Verlag, München (1972)

18. GIBBONS, R.J.; SOKRANSKY, S.S.: Intracellular polysaccharide storage by organism in dental plaque. Its relation to dental caries and microbial ecologie of the oral cavity.
Arch. Oral Biol. 7, 73 (1972)

19. GIBBONS, R.J.; BANGHART, S.B.: Synthesis of extracellular Dextran by Cariogenic Bacteria and its Presence in Human Dental Plaque.
Arch. Oral Biol. 12, 11 (1967)

20. GUGGENHEIM, B. and SCHROEDER, H.E.: Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci.
Helv. Odont. Acta 11, 131 (1967)

21. GUGGENHEIM, B.; KÖNIG, K.G.; MÜHLEMANN, H.R.; REGLATI, B.: Effect of Dextranase In Rats Harbouring An Indegenious Cariogenic Bacterial Flora.
Arch. Oral Biol. 14, 555 (1968)

22. GUGGENHEIM, B.: Enzymatic Hydrolysis and structure of waterinsoluble glucan produced by glycosyltransferases from a strain of streptococcus mutans.
Helv. Odont. Acta 14, 89 (1970)

23. GUGGENHEIM, B.; REGOLATI, B.; MÜHLEMANN, H.R.: Caries and Plaque Inhibition by Mutanase in Rats.
Caries Research 6, 289 (1972)

24. GUGGENHEIM, B.: Die Rolle mikrobieller Zahnbeläge in der Ätiologie von Zahnkaries und parodontalen Erkrankungen.
Path. Microbiol. 40, 207 (1974)

25. HAMADA, S., OOSHIMA, T., MASUDA, N., MIZUNO, J., and SOBUE, S.: Inhibition of rat dental caries by dextranase from a strain of Spicaria violacea.
Japan. J. Microbiol. 20, 321 (1976)

26. JOHN, M., TRENEL, G., and DELLWEG, H.: Quantitative chromatography of homolotous glucose oligomers and other saccharides using polyacrylamide gel.
J. Chromatog. 42, 376 (1969)

27. JOHNSON, M.C.; BOZZOLA, J.; SHECHMEISTER, J.L.; SHKLAIR, J.L.: Biochemical Study on the Relationship of Extracellular Glucan to Adherence and Cariogenity in Streptococcus mutans and an Extracellular Polysaccharide Mutant.
J. Bact. 129, 351 (1977)

28. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Georg - Thieme - Verlag, Stuttgart 1974

29. KELSTRUP, J., FUNDER-NIELSEN, T.D.,and MØLLER, E.N.: Enzymatic reduction of the colonization of Streptococcus mutans in human dental plaque.
Acta Odont. Scand. 31, 249 (1973)

30. KELSTRUP, J., HOLM-PEDERSEN, P., and POULSEN, S.: Reduction of the formation of dental plaque and gingivitis in humans by crude mutanase.
Scand. J. Dent. Res. 86, 93 (1978)

31. KEYES, P.H.; HICKS, A.; GOLDMAN, B.M.; MCCABE, R.M.; FITZGERALD, R.J.: Dispersion of dextranous bacterial plaques on human teeth with dextranase.
J. Amer. Dent. Ass. 82, 136 (1971)

32. KÖNIG, K.G.; GUGGENHEIM, B.: In- vivo- Effects of Dextranase in Plaque and Caries.
Helv. odont. Acta 12, 48 (1968)

33. LEACH, S.A.: Dextranase and Dental Caries.
Brit. Dent. J. 7, 325 (1969)

34. LEWICKI, W.J., LONG, L.W., and EDWARDS, J.R.: Determination of the structure of a broth dextran produced by a cariogenic streptococcus. Carbohydr. Res. 17, 175 (1971)

35. LOBENE, R.R.: A clinical study of the effect of a dextranase on human dental plaque. J. Amer. Ass. 82, 132 (1971)

36. MORRIS, D.L.: The quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. Science 107, 254 (1948)

37. MURAYAMA, Y., WADA, H., HAYASHI, H., UCHIDA, T., YOKOMIZO, I., and HAMADA, S.: Effects of dextranase from Spicaria violaceae on the polysaccharides produced by oral streptococci and on human dental plaque. J. Dent. Res. 52, 658 (1973)

38. NEWBRUN, E.: Extracellular Polysaccharides Synthesized by Glycosyltransferases of Oral Streptococci. Caries Research 6, 132 (1972)

39. NYMAN, S.; LINDHE, J.; JANSON, J-C.: The effect of bacterial dextranase on human dental plaque formation and gingivitis development. Odont. Revy 23, 243 (1972)

40. SCHMIDT, H.; TRAUTNER, K.; BRAMSTEDT, F.: Abbau wasserunlöslicher Streptokokken-Polysaccharide durch Dextranasepräparate. Dtsch. zahnärztl. Z. 29, 959 (1974)

41. TRAUTNER, K.; GEHRING, F.; LOHMANN, D.: Extracellular Glucans Synthesized By Strains Of Two Types of Streptococcus Mutans In Vitro. Arch. Oral Biol. 23, 175 (1978)

42. TREVELYAN, W.E.; FORREST, R.S.; HARRISON, H.S.: Determination of Yeast Carbohydrates with anthrone reagent. Nature (london) 170, 626 (1952)

43. HUTSON, D.H.; WEIGEL, H.: Studies on dextran and dextranases, 4. Mechanism of the action of intra- and extra-cellular mould hydrolases.
Biochem. J. 88, 588 (1963)

Herrn Professor Dr. F. Gehring danke ich besonders dafür, daß ich das Thema, das mir Herr Professor Dr. F. Bramstedt überlassen hatte, nach dessen Tod weiterführen konnte. Ebenso danke ich für die Übernahme des Referates.

Herrn Professor Dr. R. Naujoks danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. K. Trautner bin ich dankbar für seine stetige Unterstützung beim Werdegang dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 15. August 1952 wurde ich als Tochter des Lokomotivführers Rudolf Kallert und seiner Ehefrau Kunigunda, geborene Brunn, in Ochsenfurt geboren.
Von September 1959 bis Juli 1963 besuchte ich die Volksschule in Würzburg. Im gleichen Jahr trat ich auf das Mozartgymnasium in Würzburg über, wo ich im Juni 1972 mein Abitur ablegte.
Im November 1972 begann ich an der Universität Würzburg mit dem Studium der Zahnmedizin. Nach bestandener naturwissenschaftlicher Vorprüfung im Oktober 1973 und zahnärztlicher Vorprüfung im April 1975 legte ich hier am 31.01.1978 das Staatsexamen ab.
Nach knapp 6-monatiger Tätigkeit an der Universitätsklinik Würzburg arbeite ich nun in einer Hamburger Zahnarztpraxis.

Ruth Kallert

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80